

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-106149

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)11月15日

| | | | | |
|---------------------------|------|--------|-----|--------|
| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 9/48 | | | | |
| // (C 1 2 N 9/48 | | | | |
| C 1 2 R 1:025) | | | | |
| (C 1 2 N 9/48 | | | | |
| C 1 2 R 1:15) | | | | |

請求項の数3 (全 17 頁) 最終頁に続く

| | |
|-----------|-----------------|
| (21) 出願番号 | 特願昭63-51573 |
| (22) 出願日 | 昭和63年(1988)3月7日 |
| (65) 公開番号 | 特開平1-225482 |
| (43) 公開日 | 平成1年(1989)9月8日 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-9915 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-9916 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-9917 |
| 微生物の受託番号 | FERM P-9918 |

| | |
|----------|--------------------|
| (71) 出願人 | 999999999 |
| | 財団法人相模中央化学研究所 |
| | 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号 |
| (72) 発明者 | 浅野 泰久 |
| | 神奈川県相模原市南台1-9-1 |
| (72) 発明者 | 仲沢 章子 |
| | 神奈川県相模原市東大沼2-12-1 |
| (72) 発明者 | 加藤 康夫 |
| | 神奈川県相模原市西大沼4-4-1 |
| (72) 発明者 | 近藤 聖 |
| | 神奈川県大和市中央林間5-16-4 |
| (74) 代理人 | 弁理士 青木 朗 (外4名) |
| 審査官 | 富永 みどり |

(54) 【発明の名称】 アミノペプチダーゼ及びその使用

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質:

(1) 作用: 次式に示す反応を触媒する:

D-アミノ酸アミド + H₂O

→ D-アミノ酸 + NH₃

(2) 基質特異性: D-アラニンアミドが良好な基質であり、N末端が遊離であるD-アラニンとアンモニアとのアミド、D-アラニンと各種アルキルアミンとのアミド、D-アラニンのエステル等が基質となる:

(3) 至適pH: pH8.5付近が至適である:

(4) pH安定性: 各pHの緩衝液(0.05M)中、30℃にて1時間保温した後の残存活性を測定した場合、pH7.0~10.0付近がある:

(5) 至適温度: 45℃付近における活性が最大である: 及び

2

(6) 分子量: 高速液体クロマトグラフィー(TSKG3000 SW)により約122,000と算出される:

を有するアミノペプチダーゼ。

【請求項2】 アクロモバクター(Achromobacter)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、バシルス属(Bacillus)、マイクロコッカス(Micrococcus)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、プロタミノバクター(Protaminobacter)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、又はストレプトマイセス(Streptomyces)属細菌の培養物、菌体、又は菌体処理物をN-置換されている場合があるD-アミノ酸アミド、N末端がD-アミノ酸であるペプチド、もしくはD-アミノ酸エステル、又はこれらの塩、あるいはこれらと、対

応するL-アミノ酸誘導体との混合物に作用させて立体特異的にD-アミノ酸を生成せしめることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法。

【請求項3】アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、バシルス属 (*Bacillus*)、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、プロタミノバクター (*Protaminobacter*) 属、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、又はストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属細菌の培養物、菌体、又は菌体処理物の存在下で、N-置換されている場合があるD-アミノ酸アミド、N末端がD-アミノ酸であるペプチド、もしくはD-アミノ酸エステル、又はこれらの塩、あるいはこれらと、対応するL-アミノ酸誘導体との混合物と、アミン又はその塩とを反応せしめて立体特異的にD-アミノ酸N-置換アミド又はその塩を生成せしめることを特徴とするD-アミノ酸N-置換アミドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

この発明は、新規なアミノペプチダーゼ及びその製造方法、該酵素を生産する微生物、該酵素又は該微生物を使用するD-アミノ酸の製造法、並びに該酵素又は該微生物を使用するD-アミノ酸N-置換アミドの製造法に関する。D-アラニンアルキルアミドは、人工甘味料の合成原料として有用である (特公昭61-9320明細書)。

【従来の技術】

アミノペプチダーゼとは、ペプチドのN末端よりアミノ酸を順次遊離するエキソペプチダーゼのことをいう (EC 3.4.11.) 「酵素ハンドブック」、p.531-536、朝倉書店1982。) アミノペプチダーゼは、通常、L-アミノ酸よりなるペプチドにL立体特異的に作用してL-アミノ酸を遊離する。それらのうちD-アミノ酸をN末端とするペプチドに非立体特異的に作用するアミノペプチダーゼもわずかに知られているが、一般にその反応速度はL-アミノ酸よりなるペプチドに対する反応速度よりはるかに遅い。

ロビンソンら (Journal of Biological Chemistry, 202, 1 (1953))、ホブス (Archives of Biochemistry and Biophysics, 114, 567 (1966))、ミナミウラら (Journal of Fermentation Technology, 33, 653 (1969))、プラスコットら (Journal of Biochemistry, 75, 185 (1974)) は、各種生物由来のアミノペプチダーゼが、L-アミノ酸からなるペプチドに作用するのみならず、D-アミノ酸をN末端とするペプチドに対してもわずかに作用することを報告しているが、これらは、D-アミノ酸からなるペプチドにのみ特異的に作用するアミノペプチダーゼではない。

チエリーら (Journal of Basic Microbiology, 5, 299

(1986)) は、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属細菌の産生するアシルアミド・アミドヒドロラーゼ (EC 3.5.1.4) がD-アラニンアミドにも作用することを報告しているが、D立体特異的な加水分解ではない。又、この酵素はアミノペプチダーゼではない。

特開昭57-13000、特開昭59-159789、特開昭60-36446、特開昭62-55097、特開昭62-253397には、各種微生物によるDL-アミノ酸アミド又は、L-アミノ酸アミドの、対応するL-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学的見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、D-アミノ酸アミド含有物のD立体特異的な加水分解については全く記載されていない。

特開昭60-184392にはアクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属、及びクルチア (*Kurthia*) 属細菌菌体によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学的見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分解反応はD-アミノ酸アミドを原料とするものであり、D-アミノ酸アミド含有物のD立体特異的な加水分解については確認されていない。

特開昭61-96989はロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) 菌体によるD-アラニンアミド、D-バリンアミド、D-アミノ酪酸アミド、D-ロイシニアミド、D-セリンアミド、又はD-スレオニンアミドを対応するD-アミノ酸へ酵素的に加水分解する方法を特許請求し、実施例においては、D-アラニンアミド、D-バリンアミドおよびD-ロイシニアミドを対応するD-アミノ酸へ酵素的に加水分解する方法を記載しているが、酵素化学的見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、D-アミノ酸アミド含有物のD立体特異的な加水分解については全く記載されていない。

特開昭61-274690には、シュードモナス・フローレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、及び、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 菌体によるD-メチオニンアミド、D-グルタミンアミド、D-スレオニンアミド、D-ロイシニアミド、D-フェニルアラニンアミド、D-チロシニアミド、およびD-バリンアミドのそれぞれ対応するD-アミノ酸への加水分解法が記載されているが、酵素化学的見地からいかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分解反応はD-アミノ酸アミドを原料とするものであり、D-アミノ酸アミドとL-アミノ酸アミドとの混合物のD立体特異的な加水分解については全く記載されていない。

特公昭61-68には、D-アミノ酸を含むオリゴペプチドに作用するストレプトマイセス属に属する放線菌由来の

10

20

30

40

50

D-アミノ酸ペプチダーゼの製造法が記されているが、本酵素はペプチドのC末端に作用するカルボキシペプチダーゼ様酵素であって、D-アミノ酸誘導体に特異的なアミノペプチダーゼではない。

従って、D-アミノ酸誘導体に特異的なアミノペプチダーゼは従来全く知れておらず、又、該酵素を用い、D-アミノ酸アミド含有物を原料としてD立体特異的加水分解を行い、D-アミノ酸を合成する方法については全く知られていない。

酵素あるいは微生物を用いてD-アミノ酸を合成する方法は、ストレプトマイセス属に属する法線菌由来のD立体特異的なアミノ酸アシラーゼを用いてN-アセチルDL-アミノ酸を光学分割し、D-フェニルグリシンやD-バリンを合成する方法（それぞれ、特公昭53-36035及び特開昭63-39598）、ヒダントイン化合物のシュードモナス属細菌によるD立体特異的加水分解による方法（特公昭56-1911）、 α -ケート酸を原料としてD-アミノ酸トランスアミナーゼとアミノ基供与体再生系を利用するD-アラニンを除くD-アミノ酸の合成方法（特開昭62-205790）等が挙げられる。しかしながら、D-アミノ酸アミド含有物を原料とし、D-アミノ酸アミドに特異的な酵素を用いてD-アミノ酸を合成する方法は全く知られていない。

ところで、ペプチドの合成は化学合成法によりものが主であるが、保護基を必要とする、ラセミ化及び副反応が起きやすい等の問題点を有している。一方、近年、ペプチダーゼ、プロテアーゼ等アミド結合加水分解酵素を触媒として用い、逆反応条件でペプチド合成を行う技術が開発されている。酵素によるペプチド結合合成反応は反応条件が温和であり、化学合成法が有する上記の問題点を回避することができる優れた方法である。

酵素法によるペプチド合成法は、これまでトリプシン、 α -キモトリプシン、ペプシン、パパイン、サーモライシン、ズブチリシン、プロナーゼ等のエンドペプチダーゼや、エキソペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼ等を用いてきた。酵素によるペプチド合成の重要な方法として、ペプチド結合の加水分解の逆反応及び、アミノ酸アルキルエステルのアミノリシス法が挙げられるが、いずれの合成法においても、基質の酸部分となるアミノ酸誘導体のアミノ基はことごとく保護されていなければならなかった。一方、ペプチドのN末端よりアミノ酸を順次遊離するエキソペプチダーゼであるアミノペプチダーゼをペプチド合成に利用する研究は従来知られていなかった。

D-アミノ酸は天然には稀なアミノ酸である。天然の蛋白は、L-アミノ酸から出来ており、従って、それらの加水分解酵素をペプチド結合合成反応に用いる手法はL-アミノ酸からなるペプチド合成法として発達してきた。既知の蛋白質加水分解酵素を用いる、D-アミノ酸を含むペプチドの合成反応が報告されている。例えば、

モリハラら（*Journal of Biochemistry*, 84, 1277 (1978)）は、Z-L-フェニルアラニル-D-ロイシンアミドの α -キモトリプシンの触媒による合成法を示した。それ以来、ストイネバとベトコフ（*FEBS Letters*, 183, 103 (1985)）、ウエストとウォング（*Journal of Organic Chemistry*, 51, 2728 (1986)）、バルバスとウォング（*Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, 1987, 533）、マルゴリンとクリバノフ（*Journal of American Chemical Society*, 109, 3802 (1987)）、マツスら（*Biotechnology Letters* 9, 233 (1987)）は、 α -キモトリプシンあるいはリパーゼを接触として用いるD-アミノ酸を含むペプチドの合成法を記載している。しかし、これらのエンドペプチダーゼを用いる合成法は、ことごとく酸部分のアミノ酸誘導体のアミノ基が保護された化合物を基質としており、そのアミノ基が遊離である化合物を基質とする合成については全く記載されていない。又、これらの合成では、D-アミノ酸はアミノ部分に含まれており、本発明とは異なる。

マルゴリンら、（*Journal of American Chemical Society*, 109, 7885 (1987)）には、N-ホルミルD-アラニン2-クロロエチルエステルを酸部分とし、D-アラニンアミド等をアミン部分とするズブチリシンを触媒とする合成を報告している。しかしながら、これらの報告にあるD-アミノ酸アミドの酵素的合成法においては、ことごとく酸部分に保護基を必要としており、本発明とは異なる。又、酸部分にDL-アミノ酸誘導体を用い、立体選択的なアミノリシスによるD-アミノ酸アミド合成法は知られていない。

〔発明が解決しようとする課題〕
従って本発明は、今まで存在することが全く知られていなかったD-アミノ酸誘導体に特異的なアミノペプチダーゼ、該酵素の新規な製造方法、該酵素を利用するD-アミノ酸の新規な製造法、並びに該酵素を用いて、酸部分のアミノ酸誘導体を立体選択的にD-アミノ酸アミドに導く新規なD-アミノ酸アミドの製造法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は、該酵素を生産する新規な微生物及び該酵素の新規な製造方法を開発するために、D-アミノ酸誘導体に特異的に作用するアミノペプチダーゼ活性を有する菌株部を広範囲にスクリーニングしたところ、多くの細菌が新規なD-アミノ酸アミノペプチダーゼを生産することを見出した。

従って本発明は、D-アミノ酸誘導体に特異的に作用することを特徴とするアミノペプチダーゼ；アミノペプチダーゼを生産する細菌を培養し、この培養物から前記酵素を採取することを特徴とする前記酵素の製造方法；前記酵素又は該酵素の含有物を下でD-アミノ酸誘導体に作用させてD-アミノ酸を生成せしめ、該D-アミノ酸を採取することを特徴とするD-アミノ酸の製造方法；

従って本発明は、D-アミノ酸誘導体に特異的に作用することを特徴とするアミノペプチダーゼ；アミノペプチダーゼを生産する細菌を培養し、この培養物から前記酵素を採取することを特徴とする前記酵素の製造方法；前記酵素又は該酵素の含有物を下でD-アミノ酸誘導体に作用させてD-アミノ酸を生成せしめ、該D-アミノ酸を採取することを特徴とするD-アミノ酸の製造方法；

並びに前記酸素又は該酵素の含有物の存在下でD-アミノ酸誘導体とアミンとを反応せしめてD-アミノ酸N-置換アミドを生成せしめ、これを採用することを特徴とするD-アミノ酸N-置換アミドの製造方法を提供するものである。

〔具体的な説明〕

(1) 微生物

本発明において使用する微生物としてD-アミノ酸に特異的なアミノペプチダーゼを生産ができるものであればよく、このような微生物は保存菌のなかから選択することができる場合もあり、また自然界から分離することができる。

このような微生物としては、保存菌株中に見出されたアクロモバクター・シクロラステス (*Achromobacter cycloclastes*) IAM 1013、アクロモバクター・デリカツラス (*Achromobacter delicatulus*) IAM 1433、フラボバクテリウム・エステロアロマティカム (*Flavobacterium esteroaromaticum*) IFO 3751、フラボバクテリウム・スアベロレンズ (*F. suaverolens*) IFO 3752、バシルス・セレウス (*Bacillus cereus*) IFO 3001、バシルス・スフェリカス (*B. sphaericus*) IFO 3341、バシルス・スフェリカス IFO 3527、バシルス・チアミノリチカス (*B. thiamnolyticus*) IAM 1034、バシルス・ステアローサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) IFO 12550、ミクロコッカス・ロゼウス (*Micrococcus roseus*) IFO 3768、ミクロコッカス・sp. (*Micrococcus sp.*) SCRC 414、コリネバクテリウム・スベドニウム (*Corynebacterium speditonicum*) IFO 3306、シュードモナス・アエルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) IFO 3080、シュードモナス・ブチダ IFO 12653 (*P. putida*)、プロタミノバクタ・ルーバー (*Protaminobacter ruber*) IFO 3708、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) IFO 3082、ストレプトマイセス・グリセオラス (*Streptomyces griseolus*) IFO 3403、及びストレプトマイセス・フルビシムス (*Sptreptomyces fulvissimu**)

第

1

表

菌の同定試験①

| 観察項目 | SCRC C1-16 | SCRC C1-17 | SCRC C1-38 | SCRC C2-9 | SCRC N1-31 |
|---------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| a) 形態 | | | | | |
| 1 細胞の型 | 桿菌 | 桿菌 | 桿菌 | 桿菌 | 桿菌 |
| 大きさ | 0.8×1.3μm | 0.8×1.3μm | 0.8×1.3μm | 0.5×1.9μm | 0.5×1.9μm |
| 2 多形性の有無 | — | — | — | — | — |
| 3 運動性の有無 | + | + | + | — | — |
| 4 胞子の有無 | — | — | — | — | — |
| 5 グラム染色 | — | — | — | + | + |
| 6 抗酸性 | — | — | — | — | — |
| b) 各培地における生育状態 | | | | | |
| 1 肉汁寒天平板培養(30℃、3日間) | | | | | |
| イ) コロニー形状(直径、mm) | 5 | 6 | 4 | 2 | 3 |

* s) IFO 13482を挙げることができる。これらの保存菌はそれぞれ前記の寄託番号のもとにIFO又はIAMから自由に入手することができる。

セルロモナスに属する微生物としてはセルロモナスsp.S CRC 631 (京都大学農学部保存菌AKU-676, ヤマダラ, Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2325, 1982より入手)を挙げることができる。セルロモナスsp. SCRC 631が工業技術院微生物工業技術研究所に備考研菌寄第9918号 (FERM P-9918) と寄託されている。ミクロコッカスに属する微生物としてはミクロコッカスsp. SCRC 414 (京都大学農学部保存菌AKU-510, オガタラ, Agricultural and Biological Chemistry, 30, 176, 1966より入手)を挙げることができる。ミクロコッカスsp. SCRC 414が工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第9917号 (FERM P-9917) として寄託されている。

アクロモバクターに属する微生物としては、例えば本発明者により分離された新菌株アクロモバクターsp. SCRC C1-38、アクロモバクターsp. SCRC C1-16、アクロモバクターsp. SCRC C1-17を挙げることができる。これらの菌株の菌学的性質は非常に近似しており、これらの代表株としてアクロモバクターsp. SCRC C1-38が工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第9916号 (FERM P-9916) として寄託されている。アルスロバクターに属する微生物としては、例えば本発明者により分離された新菌株アルスロバクターsp. SCRC C2-9、アルスロバクターsp. SCRC N1-31を挙げることができる。これらの菌株の菌学的性質は非常に近似しており、これらの代表株としてアルスロバクターsp. SCRC N1-31が工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第9915号 (FERM P-9915) と寄託されている。

これらの菌株の分離源はいずれも神奈川県相模市である。

前記の新規な菌株は第1表に示すような菌学的性質を有する。

| 観察項目 | SCRC C1-16 | SCRC C1-17 | SCRC C1-38 | SCRC C2-9 | SCRC N1-31 |
|---------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| ロ)コロニーの形 | 円形 | 円形 | 円形 | 円形 | 円形 |
| ハ)コロニーの表面の形状 | 平滑 | 平滑 | 平滑 | 平滑 | 平滑 |
| ニ)コロニーの隆起状態 | 球面 | 球面 | 円錐状 | 円錐状 | 円錐状 |
| ホ)コロニーの周縁 | 全縁 | 全縁 | 全縁 | 全縁 | 全縁 |
| ヘ)コロニーの色調 | 淡ベージュ | 淡ベージュ | ベージュ | 淡黄色 | 淡ベージュ |
| ト)コロニーの透明度 | 不透明 | 不透明 | 不透明 | 不透明 | 不透明 |
| チ)コロニーの光沢 | あり | あり | 鈍光沢 | 鈍光沢 | あり |
| リ)可溶性色素の生成 | — | — | — | — | — |
| 2 肉汁寒天斜面培養(30℃、3日間) | | | | | |
| イ)生育の良否 | 良好 | 良好 | やや良好 | 良好 | 良好 |
| ロ)コロニーの光沢 | あり | あり | あり | あり | あり |
| 3 肉汁液体培養(30℃、7日間) | | | | | |
| イ)表面の生育 | あり | あり | なし | なし | わずかにあり |
| ロ)濁度 | やや濁る | やや濁る | かすかに濁る | かすかに濁る | かすかに濁る |
| ハ)沈殿 | 粉状 | 粉状 | 粉状 | 粉状 | 粉状 |
| ニ)ガス発生 | なし | なし | なし | なし | なし |
| 4 肉汁ゼラチン(30℃、7日間) | | | | | |
| ゼラチン液化 | | — | — | | |
| 5 リトマスミルク(30℃、7日間) | 青変 | 青変 | 変化なし | 赤変 | 赤変 |
| c)生理学的性質 | | | | | |
| 1 硝酸塩の還元 | + | + | — | — | + |
| 2 脱窒 | + | + | — | — | + |
| 3 MR | — | — | — | — | — |
| 4 VP | — | — | — | — | — |
| 5 インドール生成 | — | — | — | — | — |
| 6 硫化水素の生成 | — | — | — | — | — |
| 7 デンプンの加水分解 | — | — | — | — | — |
| 8 クエン酸利用 | | | | | |
| イ)Koser | + | + | — | — | — |
| ロ)Christensen | + | + | — | — | — |
| 9 色素生成 | | | | | |
| イ)King A 培地 | — | — | — | — | — |
| ロ)King B 培地 | — | — | — | — | — |
| 10 ウレアーゼ | + | + | + | — | — |
| 11 オキシダーゼ | + | + | + | — | — |
| 12 カタラーゼ | + | + | + | + | + |
| 13 生育の範囲 | | | | | |
| イ)pH | 5~10 | 5~11 | 5~10 | 5~10 | 8~9 |
| ロ)温度 | | | | | |
| 30℃ | + | + | + | + | + |
| 37℃ | + | + | + | — | + |
| 41℃ | — | — | — | — | — |
| 14 酸素に対する態度 | 好気性 | 好気性 | 好気性 | 好気性 | 好気性 |
| 15 O-Fテスト(グルコース) | 酸化的 | 酸化的 | 酸化的 | 弱く発酵的 | 弱く酸化的 |
| 16 糖類からの酸およびガスの生成 | 酸 ガス | 酸 ガス | 酸 ガス | 酸 ガス | 酸 ガス |
| 1 し-アラビノース | + | + | — | — | — |
| 2 D-キシロース | + | + | + | — | — |
| 3 D-グルコース | + | — | + | + | — |

| 11 | | 12 | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|------------|---|------------|---|-----------------------|---|----------------|---|------------|---|
| 観察項目 | | SCRC C1-16 | | SCRC C1-17 | | SCRC C1-38 | | SCRC C2-9 | | SCRC N1-31 | |
| 4 | D-マンノース | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 5 | D-フラクトース | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 6 | D-ガラクトース | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 7 | 麦芽糖 | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | - |
| 8 | ショ糖 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 9 | 乳糖 | - | - | - | - | - | - | ± | - | - | - |
| 10 | トレハロース | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | D-ソルビット | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | D-マンニット | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 13 | グリセリン | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 14 | デンプン | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | ラフィノース | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | イヌリン | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | D-リボース | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - |
| 18 | ソルボース | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | カルボキシメチルセルロース | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | グリコーゲン | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| e)その他の諸性質 | | | | | | | | | | | |
| ビタミン要求性 | | チアミン | | チアミン | | チアミン ピチオン ニコチン酸 | | チアミン パントテン酸 | | なし | |
| アルギニンの分解 | | | | | | | | | | | |
| 耐塩酸 | 5% | + | | + | | + | | + | | - | |
| | 7% | ± | | + | | ± | | ± | | - | |
| | 10% | - | | - | | - | | - | | - | |
| フェニルアラニン 脱アミノ酵素 | | + | | + | | + | | - | | + | |

上記の菌学的性質に基づきチェスターとクーバー (Jornal of Clinical Microbiology, 9, 425 (1979)) 及び、Manual of Clinical Microbiology 4th ed., P 330, (1985) の記述に従って、前記 SCRC C1-38、SCRC C1-16、SCRC C1-17 の菌株を次のように同定した。すなわち、グラム陰性、孢子の生成無し、短桿菌、運動性、好氣的、オキシダーゼ陽性、及びグルコースからの酸の生成有り。このような性質からアクロモバクター属に属する細菌であることが明らかである。一方、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st ed., Vol. 2., p 126 6 の分類基準に従って SCRC C2-9 及び SCRC N1-31 を次の様に同定した。すなわち、グラム陽性、コリネホルム型、非運動性、好気性、カタラーゼ陽性、ペプチドクリカンにリジンが含まれる、ミコール酸陰性。このような性質からアルスロバクター属に属する細菌であることが明らかである。

なお、これらの菌株に変異を生じさせて一層生産性の高い菌株を得ることもできる。また、これらの菌株の細胞中に存在するアミノペプチダーゼの生産に関与する遺伝子を切り出し、これを適切なベクター例えばプラスミドに挿入し、このベクターを用いて適当な宿主、例えばエッシャーリッヒア・コリ (Escherchia coli) や酵母のご

とき異種宿主もしくはアクロモバクター属細菌やアルスロバクター属細菌のごとき同種宿主を形質転換することにより、本発明のアミノペプチダーゼ生産株を人為的に創成することもできる。

(2) 酵素の製造方法

前記の微生物を培養して本発明のアミノペプチダーゼを製造しようとする場合、基礎栄養培地として、この発明の微生物が増殖し得るものであればいずれを使用してもよい。この培地は、窒素源としては例えば硫酸、酵母エキス、ペプトン、肉エキス等の1種又は複数種類を含有する。また、この培地には必要に応じて炭素源としてグルコース、澱粉、グリセリン等を加えることができる。この培地には無機塩類、例えば酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム等を加えることが好ましい。また、酵素の誘導物質となりうる少量のD-アミノ酸アミドを添加することも好ましい。D-アミノ酸アミドの添加料は基礎培地の組成、培養する菌株の性質により異なるが、およそ0.01~5%である。

培養は固体培地又は液体培地のいずれを用いてもよいが、目的酵素を多量に得るためには、液体培地を用い、振盪培養、通気・攪拌培養等により好氣的条件下で培養を行なうのが好ましい。培養温度は菌が成育し、アミノ

13

ペプチダーゼが生産される温度範囲内であればいずれの温度でも良いが、好ましくは25～45℃である。pHは5～11、好ましくは6～10の範囲である。培養時間は酵素活性が発現される時間を選べば良いが好ましくは6～72時間である。

次に得られた培養物から本発明のアミノペプチダーゼが採用されるが、精製法として通常の酵素精製法を用いることが出来る。遠心分離等によって、粗酵素を得、さらにこれに硫酸プロタミン又は硫酸ストレプトマイシンを加えて処理を行ない、塩析、有機溶媒沈澱、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を行ない、さらに硫酸アンモニウム等の塩やポリエチレングリコール等の添加による結晶化等の公知の方法によって均一の結晶酵素標品を単離することが出来る。

この方法において使用されるアミノペプチダーゼの使用形態は特に限定されない。例えば、精製された酵素を使用することができるのは、無論のこと、細胞を含有する培養液、培養生菌体、アセトン等によって脱水処理された風乾菌体、菌体破砕物、種々の段階まで精製された部分精製物を使用することが出来る。さらにこれらの酵素またはまたは酵素含有をポリアクリルアミド、光架橋性樹脂、ポリウレタン樹脂、カップカラギーナン、アルギン酸ナトリウム、イオン交換樹脂、半透膜、高分子酵素修飾剤等により固定化したものを使用することが出来る。

(3) 力価の測定法

本発明においては次の方法により力価を測定した。トリス-HCl (pH8.0) 50μmol、D-アラニンアミド 5μmol、及び適当料のサンプルを0.5mlになるように混合し、30℃において10分間反応せしめた後、沸騰水中に3分間浸して反応を停止し、生成したD-アラニンを以下の方法によって定量した。すなわち、上記反応液0.5mlに、フェノール10.6μmol、4-アミノアンチピリン0.79μmol、パーオキシダーゼ5単位を加えて、1.5mlとし、30℃において5分間保温した後、D-アミノ酸オキシダーゼを0.144単位加えて1.6mlとし、37℃において60分間振盪した。これを沸騰水中に3分間浸して反応を停止し、500nmにおける吸光度を測定して、検量線より反応液中のD-アラニン量を求めた。1分間当り1μmolのD-アラニンを生成する酵素量を1単位とした。

D-アラニン-p-ニトロアニリドを基質とするアミノペプチダーゼ活性は次のように測定した。すなわち、D-アラニン-p-ニトロアニリド10μmol、リン酸緩衝液(pH7.0) 100μmol及び酵素を含む反応液1mlを30℃において10分間保温した後、405nmにおける吸光度を測定して、p-ニトロアニリンの吸光係数から反応液中のD-アラニン量を求めた。一方L-アラニンアミドに対する酵素活性は、次のように測定した。すなわち、L-ア

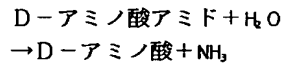
14

ラニンアミド 5μmol、トリス-塩酸 (pH8.0) 50μmol、及び酵素を含む反応液0.5mlを30℃において10分間保温した後、沸騰水中に3分間浸して反応を停止し、生成したL-アラニンを以下の方法によって定量した。すなわち、グリシン-KCl-KOH (pH10.4) 100μmol、NAD⁺ 2.5μmol、上記反応液及びL-アラニン脱水素酵素0.5単位を含む反応液1mlを30℃において5分間保温し、生成したNADHに由来する340nmにおける吸光度の増加を分光光度計により測定して、検量線より反応液中のL-アラニン量を求めた。1分間当り1μmolのL-アラニンを生成する酵素量を1単位とした。

(4) 酵素の性質


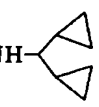
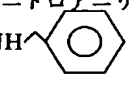
本発明のアミノペプチダーゼの1例として、SCRC C1-38により生産されるアミノペプチダーゼは次の性質を有する。

(1) 作用：次式のに示す反応を触媒する。




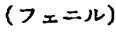

(2) 基質特異性：本酵素は、D-アラニンアミドを最も良好な基質とする。N末端が遊離であるD-アラニンとアンモニアとのアミド及び、D-アラニンと各種アルキルアミンとのアミド、D-アラニンのエステル、並びに、ペプチド等が基質となる。この1例を次の第2表に示す。

第 2 表
基 質 特 異 性

| 基 質 | 相対活性 |
|--|------|
| D-Ala-NH ₂ | 100% |
| D-Ala-Gly | 95 |
| D-Ala-D-Ala | 21 |
| D-Ala-D-Ala-D-Ala | 92 |
| D-Ala-L-Ala-L-Ala | 100 |
| D-Ala-D-Ala-D-Ala-D-Ala | 89 |
| D-Ala-NH-  | 32 |
| D-Ala-NH-  | 28 |
| D-Ala-L-Ala | 46 |
| Gly-NH ₂ | 44 |
| D-Ala-p-ナフチルアミド | 32 |
| D-Ala-p-ニトロアニリド | 96 |
| D-Ala-NH-  | 73 |

(ベンジル)

50

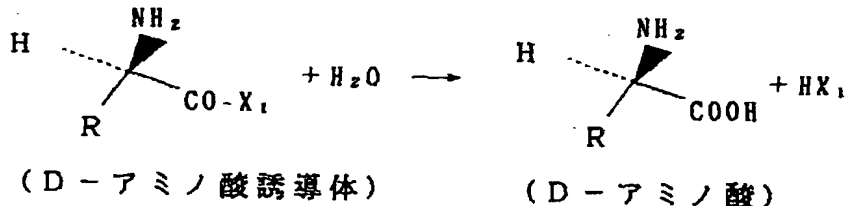
| 基 質 | 相対活性 |
|--|------|
| D-Ala-NH-  | 72 |
| D-Ala-NH-  (フェニル) | 66 |
| D-Ala-NH-  (ナチル) | 19 |
| D-Ala-NHC ₁₂ H ₂₅ | 6 |
| DL-Ala-DL-Phe | 7 |
| DL-Ala-DL-Asn | 0.5 |
| DL-Ala-DL-Leu | 26 |
| DL-Ala-DL-Ser | 20 |
| DL-Ala-DL-Met | 9.0 |
| D-Thr-NH ₂ | 2.0 |
| D-Met-NH ₂ | 0.7 |
| D-フェニルグリシン-NH ₂ | 30 |
| D-α-アミノ-n-ブチルアミド | 75 |
| D-アラニンメチルエステル | 229 |
| グリシンメチルエステル | 1.8 |
| D-ノルバリンアミド | 0.8 |
| D-ノルロイシンアミド | 29 |
| D-セリンアミド | |

(3) 至適pH:pH8.5付近が至適である。

(4) pH安定性:各pHの緩衝液(0.05M)中、30℃にて1時間保温した後の残存活性を測定した場合、pH7.0~10.0付近が安定である。

(5) 至適温度:45℃付近における活性が最大である。

(6) 温度安定性:0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)中、各*



(1)

を触媒することができ、この反応を利用してD-アミノ酸誘導体からD-アミノ酸を製造することができる。本発明の方法はD-アラニンの製造のため最も効果的に利用することができるが、D-2-アミノ酪酸、D-バリン、D-ノルバリン、D-フェニルグリシン、D-ホモフェニルアラニン等の製造のためにも適用することができる。

基質としてのD-アミノ酸誘導体として、前記反応式

(1)中のXの種類に応じて、D-アミノ酸アミド、N-置換D-アミノ酸アミド、D-アミノ酸エステル、N-末端がD-アミノ酸であるペプチド等を使用すること

(8)

特公平7-106149

16

* 温度において10分間処理した後の残存活性を測定したところ、45℃で80%の活性が残存していた。

(7) 吸収スペクトル:281nmに極大吸収を有する。

(8) 金属イオン、阻害剤の影響:銀、水銀等の金属イオン及びRCMB等のSH阻害剤によって活性が阻害される。

(9) 等電点:アンホラインを用いる焦点電気泳動により測定した場合、約4.2である。

(10) 分子量:高速液体クロマトグラフィー(TSKG3000SW)により約122,000と算出される。

(11) サブユニットの分子量:SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約59,000と算出される。

(12) 均一性:高速液体クロマトグラフィー(TSK Phenyl-5PW)により第5図Aに示す如く単一ピークを与える。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(10.0%, pH7.2)により第1図に示す如く単一にバンドを与える。

(5) D-アミノ酸の製造

本発明はまた、D-アミノ酸の製造方法を提供する。この方法においては、アミノペプチダーゼ、又はそれを含有する物を使用してD-アミノ酸の誘導体をD-アミノ酸に転換し、このD-アミノ酸を採取する。

本発明のアミノペプチダーゼは次の反応:

ができる。N-置換D-アミノ酸の置換基の代表的なものとしては低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基等が挙げられ、従って基質としてD-アミノ酸N-低級アルキルアミド、例えばD-アミノ酸-N-メチルアミド、-N-エチルアミド、-N-プロピルアミド等を使用することができる。さらに、N-置換基として芳香族基を含有する基を有する誘導体、その他第2表に示した種々のアミドを使用することができる。基質エステルとしては、例えばD-アミノ酸のα-カルボキシル基が低級アルカノールによりエステル化されたもの、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピ

ルエステル等を使用することができる。基質ペプチドとしては、D-アミノ酸-Gly、D-アミノ酸-D-Ala-D-Ala、D-アミノ酸-L-Ala-L-Ala等、第2表に示した種々のペプチドを使用することができる。

しかしながら、D-アミノ酸を工業的に製造するためには安価な基質を用いることが好ましく、このためにはN-非置換D-アミノ酸アミド、例えばD-アラニンアミド、D-2-酪酸アミド等を用いるのが好ましい。本発明に用いられるD-アミノ酸アミドは、例えば、公知の方法に従ってそれぞれのD-アミノ酸メチルエステルを合成し、続いて、アンモニアガスと反応せしめるか、あるいは、ストレッカー法により合成した α -アミノニトリルを化学的あるいは酵素的に水和して得ることができる。また、D-アミノ酸アミドの酵素による光学分割の際に副生するD-アミノ酸アミドを用いることもできる。

原料としては前記のD-アミノ酸誘導体のみならず、D-アミノ酸誘導体とD-アミノ酸誘導体とのL-アミノ酸誘導体との混合物を使用することもできる。この混合物を使用する場合、本発明の方法によれば、D-アミノ酸誘導体が立体特異的にD-アミノ酸に転換され、D,L-アミノ酸誘導体混合物を原料として立体異性的に純粋なD-アミノ酸を容易に製造することができる。

本発明の方法においては、反応触媒としてアミノペプチダーゼ又はその含有物を使用する。ここで、アミノペプチダーゼとは、前記のごとき基質にD立体異性的に作用してD-アミノ酸を生成する酵素を意味し、アミノペプチダーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、アシダーゼ、アミラーゼ、等と通称されるものを含む。この様な酵素として、前記のごとき微生物により生産される酵素を挙げることができる。しかしながら、本発明の方法においては、純粋に単離された酵素のほか、アミノペプチダーゼの酵素活性を有する任意の材料を使用することができる。この様な酵素活性材料として、例えば前に挙げた微生物のプロス、すなわち培養菌体と培地との混合物、分離された培養菌体、培養上清、菌体処理物等を使用することができる。菌体処理物としては、乾燥菌体、アセトン、エタノールのごとき溶剤で処理された乾燥菌体、菌体破砕物、酵素の製造方法の項(2)で記載した酵素の精製過程の任意の段階で得られる部分精製物、等が挙げられる。また、前記の菌体又は種々の菌体処理物を常用の酵素固定化法により固定した固定化酵素品を使用することもできる。固定化担体は、ポリアクリルアミド、光架橋性樹脂、ポリウレタン樹脂、カッパカラギーナン、アルギン酸ナトリウム、イオン交換樹脂、高分子酵素修飾剤、あるいは半透膜等を用いることができる。

工業的な実施にあたっては、生菌体、固定化菌体等を用いるのが有利である。

反応液中のアミノペプチダーゼの量は基質、例えばD-

アミノ酸アミドの濃度等によって異なり特に限定されないが、通常1~100,000単位とするのが便利である。

原料のD-アミノ酸誘導体、例えばアミドの添加量は、反応液中の前記酵素の濃度等により異なり、反応を阻害しない程度であれば特に限定されないが、1~500g/lとするのが便利である。低濃度で使用する場合には遊離塩基の形で使用することができるが、比較的高濃度で使用する場合には例えば、塩酸塩やトリル酸塩等の形で使用するのがpH調整の観点から好ましい。D-アミノ酸誘導体もしくはその含有物又はその塩はバッチ式反応においては反応開始時に一度に添加することもでき、又反応の進行と共に複数回に分割して、もしくは連続的に添加することもできる。

反応媒体としては、水、アセトン、アセニトリル、DMSO、DMF等を含む緩衝作用を有する水溶液を用いることができる。緩衝液としては、例えば、トリス-HCl緩衝液、リン酸緩衝液、イミダゾール-HCl緩衝液、HEPES-NaOH緩衝液、TRICINE-NaOH緩衝液、炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液、ホウ酸-NaOH緩衝液等を使用することができる。また、ケトン、エーテル、炭化水素、芳香族オレフィン、ハロゲン化炭化水素、有機酸エステル、アルコール、ニトリル等水と混合しない有機溶媒をも用いることもできる。例えば、メチルブチルケトン、イソプロピルエーテル、石油エーテル、ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロフォルム、二塩化メチレン、トリクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸ブチリ、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール等を水と共存させて使用することができる。また、それらの有機溶媒の混合物を使うこともできるし、水を飽和させた有機溶媒、緩衝作用を有する水溶液との二層系あるいは、ミセル、逆ミセル、エマルジョンして反応させることもできる。

反応のpHとしては、pH5~11、好ましくはpH6~10とする。

反応の温度も反応のpHと同様に考えることができるが、通常は20~60°C、好ましくは25~50°Cである。

反応時間は、特に限定されないが、反応混合物の基質濃度、酵素力価等、に依存して基質D-アミノ酸アミド含有物が充分な収率でD-アミノ酸に転換するまで反応を維持する。

生成したD-アミノ酸は任意に常法によって精製採取することができる。例えば、反応終了後に、トリクロロ酢酸を加えて蛋白質沈澱せしめ、菌体(存在する場合には)と共に濾過し、濾液からイオン交換樹脂等により精製し、結晶化する。

(6) D-アミノ酸N-置換アミドの製造法

本発明はさらに、D-アミノ酸N-置換アミドの製造方法を提供する。この方法においては、アミノペプチダーゼ又はそれを含有する物の存在下でD-アミノ酸の誘導体とN-置換アミンとを反応せしめることによりD-ア

10

20

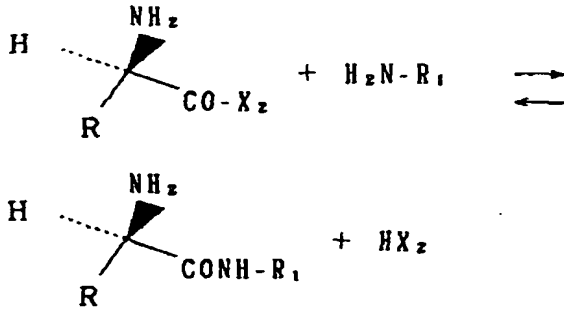
30

40

50

19

ミノ酸N-置換アミドを生成せしめ、これを取り取る。
本発明のアミノペプチダーゼは次の可逆反応：



(II)

を触媒することができ、この反応を利用してD-アミノ酸N-置換アミドを製造することができる。

この方法は、D-アラニンN-置換アミドの製造のために最も効果的に利用することができるが、D-アミノ酸部分が例えばD-2-アミノ酪酸、D-バリン、D-ノルバリン、D-フェニルグリシン等であるD-アミノ酸N-置換アミドの製造のためにも使用することができる。

基質であるD-アミノ酸誘導体としては、D-アミノ酸の製造方法(5)において記載したD-アミノ酸誘導体を使用することができ、反応性の観点から、D-アミノ酸のエステル、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル等が好ましい。気質原料としては、前記のごときD-アミノ酸誘導体を使用することができ、またこれらのD-アミノ酸誘導体とL-アミノ酸誘導体との混合物を使用することができる。D,L-混合物を使用する場合、酵素がD立体特異的に作用して、D-アミノ酸N-置換アミドが選択的に生成する。

もう一方の基質であるアミンとしては、一級炭素、二級炭素又は三級炭素にアミノ基が結合したアミンが使用される。N-置換基としてはアルキル基、シクロアルキル基、シクロアルキル-アルキル基、アリール基、アラールキル基、複素環基等が挙げられる。アルキル基は例えば直鎖又は分岐鎖のアルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、3-ペンチル基等を包含する、炭素原子数1~20個のアルキル基であることができる。またシクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等が挙げられる。シクロアルキル-アルキル基としては、例えばジシクロプロピルメチル基、フェニル基、t-ブチルシクロプロピルメチル基等が挙げられる。また、アリール基としては、例えばフェニル基が挙げられ、アラールキル基としてはベンジル基が挙げられる。複素環基としては例えばテトラヒドロチオフェン-3-イル基、チエタン-3-イル基、テトラメチル-1,1-ジオキソエタン-3-イル基等が挙げられる。これらの基は

20

さらに他の置換基により置換されていてもよい。

この方法において使用する酵素又はその含有物としては、D-アミノ酸の製造方法(5)において記載した種々の形態のものを使用することができる。

反応媒体としては、D-アミノ酸の製造方法(5)において記載した種々の媒体を使用することができる。D-アミノ酸N-置換アミド合成反応において基質のアミノ酸エステルや生成物のD-アミノ酸N-置換アミドが、酵素的、非酵素的に加水分解を受ける可能性であるので、水の存在を極力少なくした方がよく、有機溶媒中での反応が特に望ましい。

基質であるD-アミノ酸誘導体及びアミンの添加量は、反応液中の前記酵素の濃度等により異なり、反応を阻害しない程度であれば特に限定されないが、1~500g/lとするのが便利である。低濃度で使用する場合には遊離塩基の形で使用することができるが、比較的高濃度で使用する場合には例えば、塩酸塩やトリル酸塩等の形で使用するのがpH調整の観点から好ましい。基質は、バッチ式反応においては反応開始時に一度に添加することもでき、又反応の進行と共に複数回に分解して、もしくは連続的に添加することもできる。

反応のpHとしては、pH5~11、好ましくはpH6~10とする。

反応の温度も反応のpHと同様に考えることができるが、通常は20~60℃、好ましくは25~50℃である。

反応時間は、特に限定されないが、反応混合物の基質濃度、酵素力価等に依存して基質アミノ酸アミドあるいはアミノ酸エステルが十分な収率でD-アミノ酸N-置換アミドに転換されるまで反応を維持する。

生成したD-アミノ酸N-置換アミドは任意に常法によって精製採取することができる。例えば、反応終了後に、菌体や固定化した酵素剤(存在する場合には)を濾過し、濾液中に含まれるD-アミノ酸N-置換アミドを溶媒抽出やイオン交換樹脂等により精製し、結晶化する。

次に実施例によりこの発明をさらに具体的に説明する。
実施例1. アクロモバクターsp. SCRC C1-38からのアミノペプチダーゼの精製

グルコース0.1%、トリプトン0.5%、酵母エキス0.5%、 K_2HPO_4 0.1%を含有し、pH7.0に調製した培地10リッターを120℃、15分間加熱殺菌した。これにアクロモバクターsp. SCRC C1-38(微工研菌寄第9916号)を接種し、30℃で約18時間振とう培養して湿重量90gの菌体を得た。菌体を生理的食塩水で洗浄した後、0.1mM EDTA及び5mM 2-メルカプトエタノールを含むリン酸緩衝液(pH 7.0) 300mlに懸濁し、9kHzにおける超音波処理を約20分(計約2.5時間)行ない菌体を破碎した。破碎菌体は14,000×g、20分間の遠心分離で除去し、アミノペプチダーゼを含む抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロタミン硫酸を3.8g加えて、30分攪拌した後、14,000×g、

20分間の遠心分離で沈澱を除去した。この上清に固形硫酸アンモニウムを加え、30%硫酸アンモニウム飽和とした。30分攪拌の後、生成した沈澱を14,000×gで20分間の遠心分離で除去した。この上清に固形硫酸アンモニウムを加え90%硫酸アンモニウム飽和とした。14,000×gで20分間の遠心分離で得られる、酵素活性を有する沈澱を少量の0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、さらに0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で透析した。酵素液をあらかじめ0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したDEAE-トヨパール650Mのカラムに通過させ、0.1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール、及び0.1MのNaClを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出した。活性区分を集め、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)透析後、あらかじめ同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトのカラムに通過させ、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mから0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。この活性区分を集め、30%飽和となるように硫酸を加えた後、あらかじめ0.1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール、及び30%飽和の硫酸を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したブチルトヨパールのカラムに通過させ、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む30%から0%飽和の硫酸を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性区分を集め、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で透析後、約3mlに濃縮し、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノール及び0.1M NaClを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したセファデックスG-200によるゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。こうして、アミノペプチダーゼを約4,400倍に精製した。この精製過程における比活性を第3表に示す。

第 3 表

| 工程 | 総活性 (単位) | 総蛋白 (mg) | 比活性 (単位/mg) |
|-----------------|-------------|-------------|----------------|
| 1. 無細胞抽出液 | 339 | 6240 | 0.0543 |
| 2. プロタミン処理 | 435 | 6850 | 0.0635 |
| 3. 硫酸分画(30-90%) | 344 | 4970 | 0.0692 |
| 4. DEAE-トヨパール | 299 | 304 | 0.984 |
| 5. ヒドロキシアパタイト | 324 | 40.5 | 8.00 |
| 6. ブチルトヨパール | 344 | 4.47 | 77.0 |
| 7. セファデックスG-200 | 379 | 1.59 | 238 |

この酵素はPhenyl-5PWカラムクロマトグラフィーにより単一のピークを与え(第1図)、及びSDS-ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動において均一であることが証明された(第2図)。

実施例2. アクロモバクターsp. SCRS C1-38からのアミノペプチダーゼの部分精製

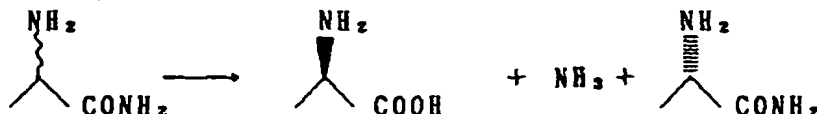
グルコール0.1%、トリプトン0.5%、酵母エキス0.5%、 K_2HPO_4 0.1%を含有し、pH7.0に調製した培地20リッターを120°C、15分間加熱殺菌した。これにアクロモバクターsp. SCRC C1-38(微工研菌寄第9916号)を接種し、

- 30°Cで約18時間振とう培養とし湿重量約186gの菌体を得た。菌体を生理的食塩水で洗浄した後、0.1mM EDTA及び5mM 2-メルカプトエタノールを含むリン酸緩衝液(pH7.0) 300mlに懸濁し、9KHzにおける超音波処理を約20分(計約5時間)行ない菌体を破碎した。破碎菌体は14,000×g、20分間の遠心分離で除去し、アミノペプチダーゼを含む素抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロタミン硫酸を7.6g加えて、30分攪拌した後、14,000×g、20分間の遠心分離で沈澱を除去した。この上清に固形硫酸アンモニウムを加え30%硫酸アンモニウム飽和とした。30分攪拌の後、精製した沈澱を14,000×gで20分間の遠心分離で除去した。この上清に固形硫酸アンモニウムを加え90%硫酸アンモニウム飽和とした。14,000×gで20分間の遠心分離で得られる、酵素活性を有する沈澱を少量の0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、さらに0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で透析した。この酵素液をあらかじめ0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化DEAE-トヨパール650Mのカラムに通過させ、0.1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール、及び0.1MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出した。活性区分を集め、30%飽和となるように硫酸を加えた後、あらかじめ0.1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール、及び30%飽和の硫酸を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したブチルトヨパールのカラム通過させ、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む30%から0%の飽和の硫酸を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性区分を集め、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で透析した。こうして、アミノペプチダーゼを約1,500倍に、収率ほぼ100%で部分精製した。この精製過程に比活性及び回収率を第4表に示す。

*素によるDL-アラニンアミドからのD-アラニンの合成

| 第 4 表 | | | |
|-----------------|-------------|-------------|----------------|
| 工程 | 総活性 (単位) | 総蛋白 (mg) | 比活性 (単位/mg) |
| 1. 無細胞抽出液 | 1170 | 5920 | 0.197 |
| 2. プロタミン処理 | 1490 | 4170 | 0.357 |
| 3. 硫酸分画(30-90%) | 1430 | 2410 | 0.594 |
| 4. DEAE-トヨパール | 1370 | 279 | 4.92 |
| 5. プチルトヨパール | 1200 | 40.0 | 30.0 |

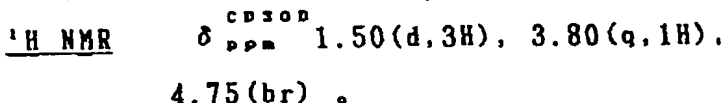
実施例3. アクロモバクター sp. SCRC C1-38 の部分精製酵素 *



DL-アラニンアミド塩酸塩 934mg (0.0075mol) を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) 75ml に溶解し、0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) で透析したアミノペプチダーゼ 210 単位 (実施例 2 において部分精製した比活性 30 単位/mg の酵素) を加えて、37°C で 1 時間保温した。反応液中に生成した D-アラニンをアンバーライト IRA-400 (Cl⁻) カラムに吸着させ、水洗後、1N 塩酸で溶出させた。この溶液を減

※水洗後、1N アンモニア水で溶出させた。減圧下濃縮し、D-アラニンを 313mg (46.9%) 得た。得られた D-アラニンは水-メタノール-イソプロピルアルコール-エーテルで再結晶し、市販の D-アラニンとスペクトルデータを比較した。

比旋光度 $[\alpha] = -14.15^\circ$ (c = 6.6, 1N HCl) (標品 Δ $[\alpha]^{20} = -14 \sim -15^\circ$ (c = 6, 1N HCl))。mp 289~291°C (標品 291~293°C)。

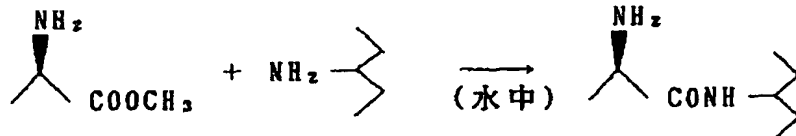


MS, m/e 44 (21%), 57 (22%), 75 (29%), 90 (100%, M⁺)。

元素分析値

| | 計算値 | 実測値 |
|---|-------|-------|
| C | 40.44 | 40.24 |
| H | 7.92 | 8.12 |
| N | 15.72 | 15.55 |

グルコース 0.1%、トリプトン 0.5%、酵母エキス 0.5%、K₂HPO₄ 0.1% を含有し、pH7.0 に調製した培地 200ml を 120°C、15 分間加熱殺菌した後、フラボバクテリウム・スアベロレンズ IF03752 を接種し、20 時間培養した。菌体を生理的食塩水で洗浄した後、実施例 1 と同様にし、菌体を破碎し、破碎菌体を遠心により除去した。上清を 0.01M リン酸緩衝液に 1 晩透析し、無細胞抽出液を得 ★



D-アラニンメチルエステル塩酸塩 0.1mmol、3-アミノペンタン 0.5mmol、アミノペプチダーゼ 13.2 単位 (実施例 2 において部分精製した比活性 30 単位/mg の酵素) を水 1ml 中に含む反応液を 30°C で保温した。反応液中に生成したアミノ酸アミドは、常法によりペーパークロマトグラフィーを行い、ニンヒドリン噴霧により発色さ

★た。

DL-アラニンアミド塩酸塩 2.49mg (20μmol)、リン酸緩衝液 (pH7.0) 100μmol、上記無細胞抽出液 200μl、D-シクロセリン 10μmol を 1ml 中に含む反応液を 30°C で 10 分反応させた。煮沸により反応液中に含まれる D-アラニンを D-アミノ酸酸化酵素を用いて定量したところ 0.46μmol の D-アラニンを含んでいた。一方反応液中に含まれる L-アラニンを L-アミノ酸脱水素酵素を用いて定量したところ 0.048μmol の L-アラニンを含んでいた。

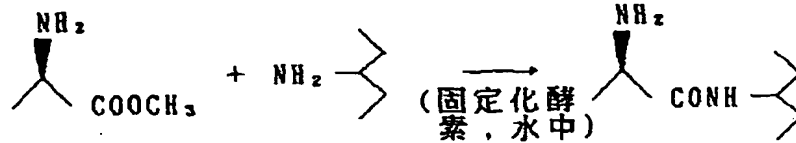
実施例 4. アクロモバクター sp. SCRC C1-38 由来の部分生成酵素を用いる水中での D-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成

せ、スポットを抽出した後、別途化学合成したアミノ酸アミド標準サンプルとして作成した検量線より定量した。その結果、反応時間 7.5 分を経過した時、収率 78% で、D-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成していた。

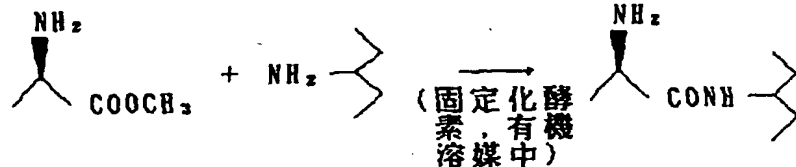
50 実施例 5. アクロモバクター sp. SCRC C1-38 由来の固定化

25

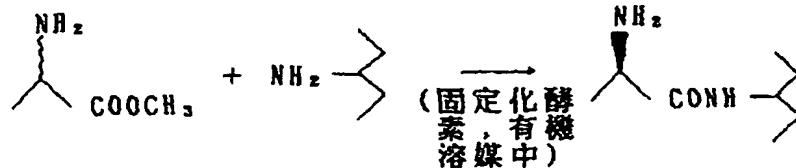
酵素を用いる水中でのD-アラニン-3-アミノペンタ* *ンアミドの合成



アクロモクターsp.SCRC C1-38由来の酵素をフクイとタナカ (Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology 29,1 (1984)) の方法に従って光架橋性樹脂ENTG-3800でフィルム状に固定化し、さらに細かく裁断した。D-アラニンメチルエステル塩酸塩0.1mmol、3-アミノペンタン0.5mmol、アミノペプチダーゼ0.94単位 (実施例2において部分精製し比活性30単位/mgの酵素) を含む固定化酵素0.5g加えて反応液1mlとし、30°Cで保温した。反応120分後、実施例4の方法に従って定量したところ、反応液中には、収率24%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成していた。 ※



アクロモバクターsp.SCRC C1-38由来の酵素をフクイとタナカ (Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology 29,1 (1984)) の方法に従ってウレタン樹脂PU-6で固定化し、さらに細かく裁断した。D-アラニンメチルエステル塩酸塩0.1mmol、3-アミノペンタン0.5mmol、アミノペプチダーゼ1.6単位 (実施例2において部分精製した比活性30単位/mgの酵素) を含む固定化酵素0.2gを酢酸ブチル、ベンゼン、トリクロロエタン、ト★



アクロモバクターsp.SCRC C1-38由来の酵素をウレタン樹脂PU-6で固定化し、さらに細かく裁断した。D-アラニンメチルエステル塩酸塩、DL-アラニンメチルエステル塩酸塩、L-アラニンメチルエステル塩酸塩の内いずれかを0.1mmol、3-アミノペンタン0.5mmol、アミノペプチダーゼ1.6単位 (実施例2において部分精製した比活性30単位/mgの酵素) を含む固定化酵素0.2gと共に酢酸ブチル水飽和溶液1ml中に加え、30°Cで保温した。D-アラニンメチルエステル塩酸塩を基質とした反応液では120分後、収率95%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成していた。

DL-アラニンメチルエステル塩酸塩を基質とした反応液では12時間後、収率50%でD-アラニン-3-アミノペ

26

※同様に、光架橋性樹脂ENTP-2000で固定化した酵素を用いて、反応180分後、収率33%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドを合成した。

10 同様に、ウレタン樹脂PU-6で固定化した酵素 (1.6単位) を用いて、上記の反応組成で60分反応したところ、収率29%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが合成できた。

実施例6. アクロモバクターsp.SCRC C1-38由来の固定化酵素を用いる有機溶媒中でのD-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成

★ルエン、及びイソプロピルエーテルのそれぞれ水飽和溶液のうち1種、1ml中に加え、30°Cで保温した。反応60分後にD-アラニン-3-アミノペンタンアミドは収率それぞれ、100,100,90,62,22%で合成された。

実施例7. アクロモバクターsp.SCRC C1-38由来の固定化酵素を用いる有機溶媒中でのD-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成

40 ンタンアミドが生成していた。L-アラニンメチルエステル塩酸塩を基質とした反応液では12時間後でも全くD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成しなかった。

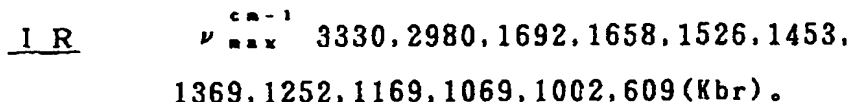
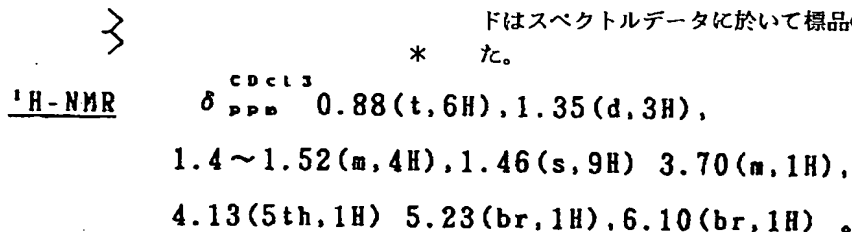
アクロモバクターsp.SCRC C1-38由来の酵素をPU-6ウレタンプレポリマーで固定化し、0.1MのDL-アラニンメチルエステル塩酸塩及び0.5Mの3-アミノペンタンを含む、水飽和の酢酸ブチル10mlに2.0g加え、30°Cで6時間振とうした。反応液を減圧濃縮し、4N HCl/酢酸エチルを加えて塩酸塩とした。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮後、縮合生成物を単一に精製し、87.9mg (収率45.2%、理論収率90.4%) 得た。

50 生成物はさらにトリエチルアミン存在下、(Boc), 0°CでB

酸化し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane
酢酸エチル=1/1) で精製し Boc-D-Ala-NH

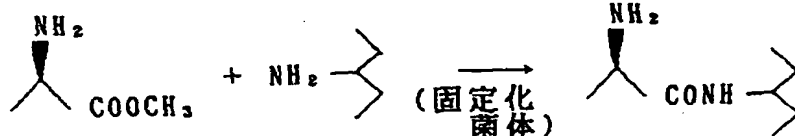
*を105mg得た。

得られたBoc化D-アラニン-3-アミノペンタンアミ
ドはスペクトルデータに於いて標品のそれとよく一致し
た。



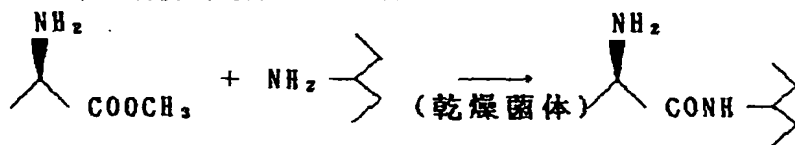
比旋光度 $\Delta[\alpha]^{20}_D = +50.56^\circ$ (c=1.25, CHCl₃) (標品 $\Delta[\alpha]^{20}_D = +50.90^\circ$ (c=1.21, CHCl₃)).

※実施例8. アクロモバクターsp. SCRC C1-38由来の固定化
菌体を用いる有機溶媒中でのD-アラニン-3-アミノ
ペンタンアミドの合成



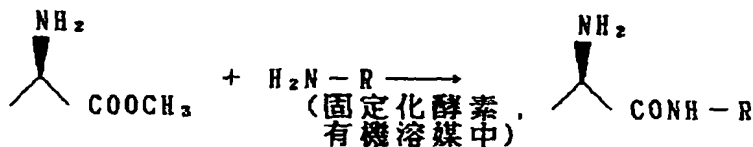
アクロモバクターsp. SCRC C1-38の生菌体200mg (0.042
単位) の光架橋性樹脂ENTG-3800固定化物、D-アラニ
ンメチルエステル塩酸塩0.1mmol、3-アミノペンタン
0.5mmolを含む水飽和の酢酸ブチルからなる反応液1ml
を、30°Cで保温したところ、240分後に、収率38%でD ★

★-アラニン-3-アミノペンタンアミドが合成できた。
実施例9. アクロモバクターsp. SCRC C1-38由来のアセト
ン乾燥菌体を用いる有機溶媒中でのD-アラニン-3-
アミノペンタンアミドの合成



アクロモバクターsp. SCRC C1-38のアセトン乾燥菌体10
0mg (4単位)、D-アラニンメチルエステル塩酸塩0.1
mmol、3-アミノペンタン0.5mmolを含む水飽和の酢酸
ブチルからなる反応液1mlを、30°Cで保温したところ、2
40分後に、収率5%でD-アラニン-3-アミノペンタ ☆

☆ンアミドが合成できた。
実施例10. アクロモバクターsp. SCRC C1-38由来の固定
化酵素を用いる有機溶媒中での各種D-アラニンN-置
換-アミドの合成

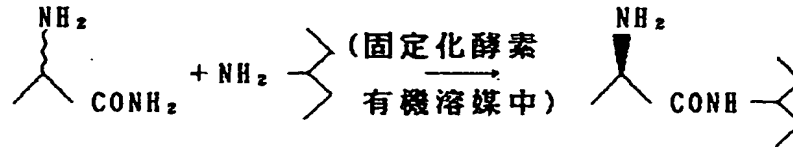


アクロモバクターsp. SCRC C1-3由来の酵素 (実施例2
において部分精製した比活性30単位/mgの酵素) をウレ
タン樹脂PU-6で固定化し、さらに細かく裁断した。D
-アラニンメチルエステル塩酸塩0.1mmol、n-ブチル
アミン、あるいはベンジルアミンの内1種0.5mmol、ア
ミンペプチダーゼ1.6単位を含む固定化酵素0.2gを酢酸
ブチル水飽和溶液1ml中に加え、30°Cで8時間保温し
た。D-アラニンn-ブチルアミド、D-アラニンベン

ジルアミドの収率は、それぞれ、70、及び14%であっ
た。なお、収率は別途合成したD-アラニナルキルア
ミドと対照として算出した。すなわち、サンプルを常法
によりダンシル化し、これをヘキサンを溶媒とする下降
法でペーパークロマトグラフィーを行い、蛍光を発する
スポットを切り取り、メタノール抽出して205nmにおける
吸光度から検量線を作成して算出した。

50 実施例11. アクロモバクターsp. SCRC C1-38由来の固定

化酵素を用いる有機溶媒中でのD-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成



アクロモバクターsp. SCRC C1-38由来の酵素をウレタン樹脂PU-6で固定化し、さらに細かく裁断した。D-アラニンアミド塩酸塩、DL-アラニンアミド塩酸塩、L-アラニンアミド塩酸塩の内いずれかを0.1mmol、3-アミノペンタン0.5mmol、アミノペプチダーゼ1.6単位（実施例2において部分精製した比活性30単位/cmの酵素）を含む固定化酵素0.2gと共に酢酸ブチル水飽和溶液1ml中に加え、30℃で保温した。D-アラニンアミド塩酸塩を基質とした反応液では480分後、収率97%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成していた。DL-アラニンアミド塩酸塩を基質とした反応液では600分後、収率48%でD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成していた。L-アラニンアミド塩酸塩を基質とした反応液では24時間後でも全くD-アラニン-3-アミノペンタンアミドが生成しなかった。

実施例12

グリセロール0.1%、トリプトン0.5%、酵母エキス0.5%、 K_2HPO_4 0.1% D-アラニンアミド塩酸塩を含有し、pH7.0に調製した培地100mlを、15分間加熱殺菌した後、各種の菌株を接種し、30℃で約16時間振とう培養した。菌体を生理的食塩水で洗浄した後、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁し、9kHzにおける超音波処理を5分間行なった。破碎菌体を遠心分離で除去し、素抽出液を得た。この素抽出液を0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）に対して4℃で1晩透析した。このようにして得た酵素液中のD-アラニン-p-ニトロアニリドおよびL-アラニンアミドに対するアミノペプチダーゼ活性を「〔具体的な説明〕（3）力価を測定」に記した方法で測定した。その結果を第5表に記す。

第5表 無細胞抽出液中のアミノ

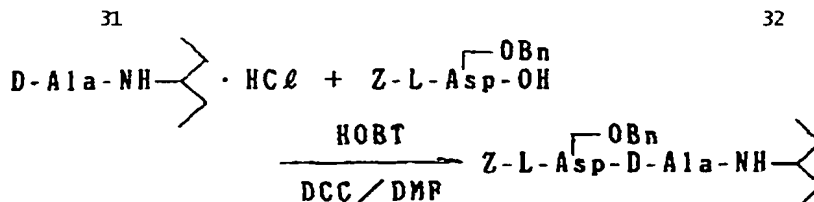
ペプチダーゼ活性

（単位/mg蛋白）

| 菌名 | 基質 | D-アラニン-p-ニトロアニリド | L-アラニンアミド |
|------------------------|----|------------------|-----------|
| アクロモバクターsp. SCRC C1-16 | | 0.056 | 0.004 |
| アクロモバクターsp. SCRC C1-17 | | 0.046 | 0.004 |
| アクロモバクターsp. SCRC C1-38 | | 0.111 | 0 |

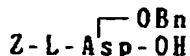
| 菌名 | 基質 | D-アラニン-p-ニトロアニリド | L-アラニンアミド |
|--------------------------------|----|------------------|-----------|
| アクロモバクター・シクロラステス IAM 1013 | | 0.407 | 0 |
| アクロモバクター・デリカッラス IAM 1433 | | 0.023 | 0.001 |
| フラボバクテリウム・エステロアロマティカム IFO 3751 | | 0.190 | 0 |
| フラボバクテリウム・スアペロレンズ IFO 3752 | | 0.186 | 0 |
| バシルス・セレウス IFO 3001 | | 0.021 | 0 |
| バシルス・スフェリカス IFO 3341 | | 0.019 | 0 |
| バシルス・スフェリカス IFO 3527 | | 0.041 | 0 |
| バシルス・チアミノリチカス IAM 1034 | | 0.009 | 0 |
| バシルス・ステアロサーモフィラス IFO 12550 | | 0.001 | 0 |
| ミクロコッカスsp. SCRC 414 | | 0.068 | 0 |
| コリネバクテリウム・スベドニカム IFO 13763 | | 0.026 | 0 |
| シュードモナス・アエルギノーザ IFO 3080 | | 0.073 | 0 |
| シュードモナス・ブチダ IFO 12653 | | 0.008 | 0.001 |
| プロタミノバクター・ルーバ IFO 3708 | | 0.002 | 0 |
| マイコバクテリウム・スメグマティス IFO 3082 | | 0.029 | 0 |
| アルスロバクターsp. SCRC C2-9 | | 0.170 | 0.027 |
| アルスロバクターsp. SCRC N1-31 | | 0.239 | 0.010 |
| ストレプトマイセス・グリセオラス IFO 3403 | | 0.012 | 0 |
| ストレプトマイセス・フルビシムス IFO 13482 | | 0.051 | 0.005 |

40 参考例1. 人工甘味料の合成



(i) β-ベンジルオキシ-N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパルチル-D-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成

酵素反応により合成したD-アラニン-3-アミノペンタンアミド・塩酸塩85mg (0.568mmol) 及び



(β-ベンジルオキシ-N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸) 203mg (0.57mmol) をアルゴン雰囲気DMF 10mlに溶解させた。反応混合物に水冷下1-ヒドロキシベンゾトリアゾール77mg (0.57mmol) 及びN-メチルモ

*ルホリン57.6mg (0.57mmol) を加えた。次いで反応液を-20°Cに冷却し、ジシクロヘキシカルボジイミド118mg (0.57mmol) のDMF溶液5mlを滴下した。室温まで徐々に昇温し、一晚攪拌後、生成したジシクロヘキシル尿素を濾別した。反応液を減圧下濃縮し、塩化メチレンを加え、さらに生じた結晶を濾別した。塩化メチレン層を5%炭酸水素ナトリウム、水、2規定塩酸、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥及び活性炭で脱色を行なった。溶媒を留去後、塩化メチレン-ヘキサンで再結晶を行ない、無色結晶を244mg (86.4%) を得た

¹H-NMR δ_{ppm} ^{CDCl₃} 0.23~0.43(m, H), 0.43~0.55

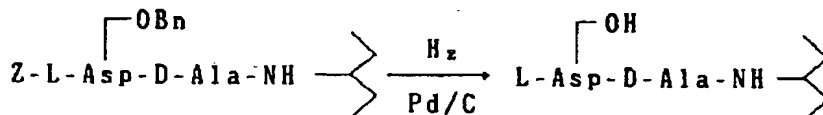
(m, 4H), 0.81~0.95(m, 2H), 1.36(d, 3H), 2.79

(dd, 1H), 3.01~3.22(m, 2H), 4.38~4.48

(m, 1H), 4.57~4.63(m, 1H), 5.06~5.18(m, 4H)

5.86(d, 1H), 6.29(d, 1H), 6.85(d, 1H), 7.29~

7.40(m, 10H)。



(ii) L-アスパルチル-D-アラニン-3-アミノペンタンアミドの合成

アルゴン雰囲気下、2保護ジベプチド252mg (0.497mmol)

1) をメタノール (15ml) に溶解し、10%Pd-C (10mg)

a) を加え、水素置換をした。一晚室温で攪拌後、生成 ※

※物をセライトで濾過し、減圧濃縮し、水-メタノールより再結晶すると無色固体のジベプチド133mg (99.8%) を単一品として得た。

比旋光度▲[α]_D²⁰ +26.92° (c=1.30CH₃OH)。

mp. 221~223°C。

¹H-NMR δ_{ppm} ^{CD₃OD} 0.91(m, 6H), 1.36(d, 3H)

1.39(m, 1H), 1.55(m, 1H),

2.59(dd, 1H), 2.70(m, 1H),

3.63(m, 1H), 4.08(dd, 1H),

4.33(q, 1H), 5.0(br)。

I R $\nu_{\max}^{c n-1}$ (KBr Disk) 3450, 3320,
2975, 1650, 1579, 1460, 1388,
1280, 1230, 1158, 918, 646 .

MS,m/e 29 (26%), 44 (100%), 57 (24%), 88 (46%), 159 (26%), 274 (5%, M⁺)

元素分析値

| | 計算値 | 実測値 |
|---|-------|-------|
| C | 52.73 | 53.16 |
| H | 8.48 | 8.40 |
| N | 15.37 | 14.99 |

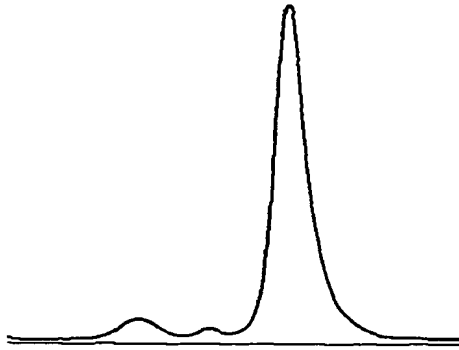
*【図面の簡単な説明】

第1図は本発明の精製酵素のPhenyl-5PWカラムクロマトグラフィーの溶出プロフィールを示し、本発明の酵素が均一であることを示すものである。

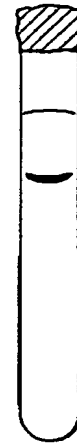
10 第2図は本発明の精製酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果をスケッチしたものであり、本発明

* の酵素が均一であることを示す。

【第1図】



【第2図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

| | |
|----------|--------|
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:07) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:265) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:38) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:32) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:06) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:465) |
| (C 1 2 N | 9/48 |
| C 1 2 R | 1:01) |